

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<p>(51) 国際特許分類 C12N 9/42, 15/56</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/03640</p> <p>(43) 国際公開日 1998年1月29日(29.01.98)</p>		
<table border="1"> <tr> <td data-bbox="178 422 829 1066"> <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02561</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月24日(24.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/194974 1996年7月24日(24.07.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJII SEIKA KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 村島弘一郎(MURASHIMA, Kouichirou)(JP/JP) 浜谷 徹(HAMAYA, Toru)(JP/JP) 古賀仁一郎(KOGA, Jinichiro)(JP/JP) 河野敏明(KONO, Toshiaki)(JP/JP) 〒350-02 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)</p> </td> <td data-bbox="829 422 1498 1066"> <p>守屋達樹(MORIYA, Tatsuki)(JP/JP) 隅田奈緒美(SUMIDA, Naomi)(JP/JP) 青柳 薫(AOYAGI, Kaoru)(JP/JP) 村上 健(MURAKAMI, Takeshi)(JP/JP) 〒250-01 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> </td> </tr> </table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02561</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月24日(24.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/194974 1996年7月24日(24.07.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJII SEIKA KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 村島弘一郎(MURASHIMA, Kouichirou)(JP/JP) 浜谷 徹(HAMAYA, Toru)(JP/JP) 古賀仁一郎(KOGA, Jinichiro)(JP/JP) 河野敏明(KONO, Toshiaki)(JP/JP) 〒350-02 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)</p>	<p>守屋達樹(MORIYA, Tatsuki)(JP/JP) 隅田奈緒美(SUMIDA, Naomi)(JP/JP) 青柳 薫(AOYAGI, Kaoru)(JP/JP) 村上 健(MURAKAMI, Takeshi)(JP/JP) 〒250-01 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02561</p> <p>(22) 国際出願日 1997年7月24日(24.07.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/194974 1996年7月24日(24.07.96)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJII SEIKA KAISHA, LTD.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 村島弘一郎(MURASHIMA, Kouichirou)(JP/JP) 浜谷 徹(HAMAYA, Toru)(JP/JP) 古賀仁一郎(KOGA, Jinichiro)(JP/JP) 河野敏明(KONO, Toshiaki)(JP/JP) 〒350-02 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)</p>	<p>守屋達樹(MORIYA, Tatsuki)(JP/JP) 隅田奈緒美(SUMIDA, Naomi)(JP/JP) 青柳 薫(AOYAGI, Kaoru)(JP/JP) 村上 健(MURAKAMI, Takeshi)(JP/JP) 〒250-01 神奈川県小田原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			
<p>(54) Title: ENZYME ENDOGLUCANASE AND CELLULASE PREPARATIONS CONTAINING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 エンドグルカナナーゼ酵素およびそれを含んでなるセルラーゼ製剤</p> <p>(57) Abstract A highly active cellulase which is to be preferably employed in eliminating fluffs from cellulose-containing fibers, denier reduction and bleaching denim-dyed cellulose fibers; and a gene thereof. This novel cellulase NCE4 isolated from <i>Humicola insolens</i> is a highly active one usable in treating various cellulose-containing fibers.</p>				

(57) 要約

セルロース含有繊維の毛羽除去、減量加工、デニム染めセルロース含有繊維の脱色加工処理に好ましく用いられる高活性セルラーゼおよびその遺伝子が開示されている。フミコーラ・インソレンスから単離された新規セルラーゼNCE4は高活性セルラーゼであり、これを種々のセルロース含有繊維処理に用いることができる。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴス ラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	YU	ユーゴスラビア
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ共和国	LA	ラオス	RU	ロシア連邦		
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LK	スリランカ	SE	スウェーデン		
EE	エストニア						

## 明 細 書

エンドグルカナーゼ酵素およびそれを含んでなるセルラーゼ製剤

## [発明の背景]

発明の分野

本発明は、セルラーゼならびにそれを含んでなるセルラーゼ製剤、それを利用したセルロース含有繊維の毛羽除去、減量加工およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工に関する。

背景技術

セルロース含有繊維を、その繊維に所望の特性を与えるためにセルラーゼで処理することが行われている。例えば、繊維業界において、セルロース含有繊維の肌触りおよび外観を改善するために、そしてデニム染めセルロース含有繊維にストーンウォッシュの外観を与えるために、セルラーゼによる処理が行われている。

また、近年、木材パルプ由来のセルロースを有機溶媒により溶解し、紡糸する再生セルロース系繊維であるテンセルが、その高い強度、吸水度等の性質、さらには環境汚染を起こしにくいその製造法から、注目を集めてきた。しかしながら、テンセルは製造工程中に毛羽が生じるために、そのままでは繊維としての商品価値は低いものとされている。そこで製造工程中に生じる毛羽をセルラーゼにより除去する方法が提案されてきた。

現在、セルロース含有繊維の処理には主に木材不朽菌であるトリコデルマ (Trichoderma) やフミコーラ (Humicola) 由来のセルラーゼが使用されている。しかしながら、その繊維に対して所望の効果を奏するには多量のセルラーゼを必要とするのが現状である。

セルロース含有繊維の肌触りおよび外観の改善やデニム染めセルロース含有繊維

維へのストーンウォッシュの外観の付与、さらにはテンセルの毛羽除去を、従来より少量の高活性セルラーゼによって実施できるとするならば、これら処理のコストをより低減出来るものと考えられる。

なお、フミコーラ由来のセルラーゼとして、WO 91/17243号公報（特表平5-509223号公報）には、43 kDのエンドグルカナーゼ遺伝子がフミコーラ・インソレンス（*Humicola insolens*）DSM1800株から単離され、その塩基配列が決定されている。

#### 〔発明の概要〕

発明者等は、今般、フミコーラ・インソレンスから、種々のセルロース含有繊維の処理に極めて有利に利用できる新規な高活性セルラーゼおよびその遺伝子を単離した。本発明はかかる知見に基づくものである。

従って、本発明は、新規なセルラーゼおよびその遺伝子の提供をその目的としている。

更に本発明は、新規なセルラーゼを利用したセルロース含有繊維の毛羽除去方法、減量加工方法、およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工方法の提供をその目的としている。

そして、本発明による新規なセルラーゼは、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の一部または1～284番の配列を有するタンパク質およびその改変タンパク質である。

また、本発明によるセルロース含有繊維の毛羽除去方法、減量加工方法、およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工方法は、上記タンパク質または改変タンパク質と、デニム染めセルロース含有繊維とを接触させる工程を含んでなるものである。

## [発明の具体的説明]

微生物の寄託

本発明によるセルラーゼ酵素遺伝子を含むプラスミド pNCE4Sal (実施例 A5 参照) で形質転換された大腸菌 JM109 株は、FERM BP-5976 (原寄託: FERM P-15732、原寄託日: 1996 年 7 月 12 日) の受託番号のもと通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1-1-3) に寄託されている。

セルラーゼおよびその遺伝子

本発明によるセルラーゼ酵素は、配列番号 1 に記載される配列の一部または 1 ~ 284 番の配列を有するタンパク質である。本発明にあって、配列番号 1 に記載される配列の一部とは、例えばプローブとして利用可能な程度の長さ、さらには、その一部の配列であっても依然としてセルラーゼ活性、とりわけエンドグルカナーゼ活性を維持するその部分配列を意味するものとする。

また、本発明には、上記タンパク質の N 末端に、更に配列番号 1 の -22 ~ -1 番までのアミノ酸配列の一部または全部を有するタンパク質も包含される。ここで、配列番号 1 の -22 ~ -1 番までのアミノ酸配列は、シグナルペプチドと考えられることから、その一部の配列とは、シグナルペプチド活性を保持するその部分配列に加え、発現宿主の種類によってプロセッシングされる位置に相違が生じた結果として N 末端に残る配列をも意味するものとする。

更に本発明には、前記タンパク質の改変タンパク質が含まれる。本発明において、改変タンパク質とは、上記タンパク質のアミノ酸配列において、一~数個のアミノ酸の付加、挿入、削除、欠失、または置換などの改変が生じたタンパク質であって、依然としてセルラーゼ活性、とりわけエンドグルカナーゼ活性を保持するものを意味するものとする。

なお、以下でこの配列表 1 に記載されるアミノ酸配列の 1 ~ 284 番までの配

列をセルラーゼNCE4、そしてその遺伝子をセルラーゼNCE4遺伝子と呼ぶ場合がある。

本発明によるセルラーゼは高活性であり、少量で種々の用途において所望の効果をを得ることができる。例えば、本発明の好ましい態様によれば、NCE4には、フミコーラ・インソレンスの培養液から調製した未精製のセルラーゼと比較して、その約100分の1のタンパク質量で同等のセルロース系繊維の毛羽除去効果を、その約25分の1のタンパク質量で同等のデニム染めセルロース含有繊維の脱色効果を、その約5分の1のタンパク質量で同等のセルロース系繊維の減量効果を認めることができる。よって、より効率よくまた経済的なセルロース系繊維の処理に使用することができる。

本発明の別の態様によれば、前記タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNA配列が提供される。このDNA配列の典型的配列は、配列番号2に記載される塩基配列の一部または全部を有するものである。

配列番号2に記載される塩基配列は、118～120番のATGで始まり、1089～1091番のTAAで終了するオープンリーディングフレームを有する。また、171～173番の塩基配列は284残基からなる前記成熟タンパク質に対応する。更に、配列番号2の塩基配列中にはイントロンが存在することが確認された（実施例A7参照）。

タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするDNA配列は容易に定まり、配列番号1に記載されるアミノ酸配列の全部または一部をコードする種々の塩基配列を選択することができる。従って、本発明による配列番号1に記載されるアミノ酸配列の一部または全部をコードするDNA配列とは、配列番号2に記載される一部または全部の塩基配列に加え、同一のアミノ酸をコードする配列であって縮重関係にあるコドン塩基配列として有する配列も意味するものとする。

本発明によるDNAは、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよい。また、天然物由来のものの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。DNAの典型的な取得方法としては、フミコーラ・インソレンス由来の染色体ライブラリーまたはcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列の情報を基にして作成した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行う方法、等が挙げられる。また、前記した寄託菌より得ることも可能である。

#### 発現ベクターおよび形質転換された微生物

また、本発明によれば、前記の本発明によるDNA配列を、宿主微生物内で複製可能でかつそのDNA配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、酵母、カビなどを用いた系、および、それらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望のタンパク質を発現させるために、前記の本発明によるDNA配列の他に、その発現を制御するDNA配列や微生物を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいるのが好ましい。配列番号2の塩基配列はこれらの制御配列なども含んでいると考えられることから、この塩基配列をそのまま利用することが場合によっては有利であると考えられる。また、この発現ベクターは、セルラーゼをコードするDNA配列を反復した形（タンデム）で含んでいてもよい。これらのDNA配列を含む発現ベクターは常法に従い構築されてよい。またこの発現ベクターによる微生物の形質転換も、この分野で慣用されている方法に従い実施することができる。

この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記した本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造法が提供される。形質転換体の培養およびその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同様であってよい。また、培養液からの本発明による新規タンパク質の回収、精製も常法に従って行うことができる。

#### セルラーゼの用途／セルラーゼ調製物

本発明による上記セルラーゼは、そのまままたはセルラーゼ調製物とされて種々の用途に使用される。とりわけ、セルロース系繊維に所望の特性を付与するために使用される。具体的には、セルロース含有繊維の毛羽除去、減量加工、およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工に使用される。

セルラーゼ調製物は、本発明によるセルラーゼ酵素を、セルラーゼ調製物に一般的に含まれる成分、例えば賦形剤（例えば、乳糖、塩化ナトリウム、ソルビトール糖）、界面活性剤、防腐剤等とともに混合され製造されてよい。

本発明によるセルラーゼまたはセルラーゼ調製物による、セルロース含有繊維の毛羽除去、減量加工、およびデニム染めセルロース含有繊維の脱色加工は、セルラーゼとセルロース繊維とを接触させることで実施することができる。

接触温度、セルラーゼの量などの条件は、他の種々の条件を勘案して適宜決定されてよいが、例えばセルロース含有繊維の毛羽除去の場合、50～60℃程度の温度で、5～50 mg/lのタンパク質濃度のセルラーゼを使用することにより処理することができる。また、減量加工の場合、50～60℃程度の温度で、100～300 mg/lのタンパク質濃度のセルラーゼを使用することにより処理することができる。さらに、デニム染めセルロース含有繊維の脱色加工の場合、50～60℃程度の温度で、2～10 mg/lのタンパク質濃度のセルラーゼを使用することにより処理することができる。



## 〔実施例〕

本発明を以下の実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

実施例A1：フミコーラ・インソレンスからのテンセル毛羽除去に活性を有する成分の単離精製

フミコーラ・インソレンスMN200-1を、(N)培地(5.0%アビセル、2.0%酵母エキス、0.1%ポリペプトン、0.03%塩化カルシウム、0.03%硫酸マグネシウム、pH6.8)中、37℃で培養した。7日間培養の後、得られた培養液を7000rpmで20分間遠心することにより菌体を除き、培養上清液を粗精製セルラーゼ調製液とした。

この粗精製セルラーゼ調製液を疎水クロマトグラフィー(Phenyl-Sepharose High Performance16/100、ファルマシアバイオテク社製)に供し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、1-0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、分画した。このうち、0.1-0Mの濃度勾配のときに得られた画分にテンセル毛羽除去活性が強く認められたので、その画分を再び、疎水クロマトグラフィー(Phenyl-Sepharose High Performance16/100)に供し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、0.4-0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、活性画分を分取した。

次に、その画分を逆相クロマトグラフィー(Source15 ISO、ファルマシアバイオテク社製)に供し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、1-0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、分画した。このうち、0Mの濃度のときに得られた画分にテンセル毛羽除去活性が強く認められたので、その画分を逆相クロマトグラフィー(Source 15 PHE、ファルマシアバイオテク社製)に供し、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中、1-0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、テンセル毛羽除去活性の強い画分を精製酵素NC

E 4として単離した。このNCE 4はSDS-PAGEにおいて分子量43 kDaの単一なバンドを示した。

#### 実施例A 2：セルラーゼNCE 4の部分アミノ酸配列

##### (1) N末端アミノ酸残基の同定

実施例1において精製したタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定するため、FPLCシステム（ファルマシアバイオテック社製）でカラムクロマトグラフィーを行い（カラム：RESOURCE（商品名）RPC 3ml、0.1%のTFAを含む5%～60%アセトニトリルグラジェント）、主要なピークを分取した。

これを凍結乾燥した後、少量の水に溶解し、8%Gel SDS-PAGE mini（テフコ社製）を用いて電気泳動した。マルチフォーII電気泳動装置（ファルマシアバイオテック社製）を用いて、これをPVDF膜（ミリポア社製）に、タンパク質を電氣的にうつしとり、コマジーブリリアントブルーR-250（ナカライテスク社製）で染色した後、脱色し、水で洗浄し、風乾した。ここから分子量43 kDaのタンパク質がプロットされた部分を切り出し、これをプロテインシーケンサーModel 492（パーキンエルマー社製）に供し、N末端側アミノ酸配列を15残基決定した。得られた配列は以下の通りであった。

N末端アミノ酸配列：Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys)-(Cys)-Lys-Pro-Ser（15残基）

##### (2) ペプチドマッピング

前記(1)のFPLCによって精製されたタンパク質を凍結乾燥後、100 mM重炭酸アンモニウム緩衝液（pH 8.0）に溶解した。タンパク質に対し約1/20モル量のトリプシン（プロメガ社製）を添加し、37℃で、48時間反応させた。この分解産物をModel 172  $\mu$ プレパラティブHPLCシステム（パーキンエルマ社製）でカラムクロマトグラフィーを行い（カラム：C8 220×2.

1 mm、0.1% TFA、0% アセトニトリル～0.085% TFA、35% アセトニトリルグラジェント）、3種のペプチドを分取した。得られたペプチド断片のアミノ酸配列を前述のプロテインシーケンサーにより決定した。その結果は、以下の通りであった。

TP-1 : Tyr-Gly-Gly-Ile-Ser-Ser (6 残基)

TP-2 : Phe-Pro-Asp-Ala-Leu-Lys (6 残基)

TP-3 : Phe-Asp-Trp-Phe-Lys-Asn-Ala-Asp-Asn-Pro-Ser-Phe-Ser-Phe-Arg

\* \* \* \* \*

(15残基)

これらN末端アミノ酸配列およびペプチドマッピングによって得られたアミノ酸配列は、WO 91/17243号公報（特表平5-509223号公報）に記載されているフミコーラ・インソレンスDSM1800から得られた43 KDa エンドグルカナーゼのアミノ酸配列と相同性を示すことから、同タンパク質はセルラーゼの一種であることが強く示唆された。

また、上記配列をProtein Identification Resource (PIR) R44.0, March, 1995、またはSWISS-PROT R31.0, March 1995 に登録されている配列と比較したところ、相同性を示す配列はあるものの、同一ではなく、新規なタンパク質であることが明らかとなった。

#### 実施例A3 : ゲノムDNAライブラリーの作製

ゲノムDNAの単離はHoriuchiらの方法（Hiroyuki Horiuchi et al., J. Bacteriol., 170:272-278, 1988）に従った。

まず、フミコーラ・インソレンスMN200-1を前述（N）培地中、37℃で培養した。2日間培養の後、遠心分離（3500 rpm、10分）によって菌体を回収した。得られた菌体をフェノール処理、プロテイナーゼK、およびリボヌクレアーゼA処理、さらにポリエチレングリコール（PEG）沈殿化によりゲ

ノムDNAを得た。

つぎに、フミコーラ・インソレンスゲノムDNAをSau3A Iにより消化し、アガロースゲル電気泳動によって、9～23 kbpの範囲で部分的に分解されたことを確認した後、これをエタノール沈殿によって回収した。このDNA断片をファージベクター、EMBL3 クローニングキット（ストラタジーン社製）のBamH IアームにT4リガーゼ（東洋紡績社製）を用いて連結させた。これをエタノール沈殿後、TE（10 mM トリス塩酸（pH 8.0）、1 mM EDTA）緩衝液に溶解した。

連結混合物の全量をHohn, B.の方法(Hohn, B. Methods Enzymol., 68:299-309, 1979)に記載されている様に凍結したパッケージ成分およびギガパックIIパッケージングキット（ストラタジーン社製）を用いて、ラムダヘッドにパッケージし、得られたファージを大腸菌LE392株に感染させた。この方法により得られた $5 \times 10^4$ 個のファージライブラリーを用いて目的遺伝子のクローニングを行った。

#### 実施例A4：PCR法による長鎖プローブの作製

DNAプローブとして、フミコーラ・インソレンスの全DNAを鋳型にPCR法により増幅されたロングプローブを作製し、これを用いた。

各プライマーは、N末端およびペプチドTP-3において\*で示したアミノ酸に対応するDNAを合成した。作製した合成オリゴヌクレオチドの配列は以下に示される通りであった。

NCE4N1: 5'-GCXGA(CT)GGXAA(AG)TC(AGCT)AC-3' (17mer)

NCE4N2: 5' GCXGA(CT)GGXAA(AG)AG(CT)AC-3' (17mer)

NCE4C: 5'-CXGC(AG)TT(CT)TT(AG)AACCA(AG)TC-3' (19mer)

(X: イノシン)

PCR反応は以下の条件で行った。まず、フミコーラ・インソレンスゲノムD

NA 1  $\mu$ g に対し、プライマーとしてNCE4N1、NCE4C 各 1  $\mu$ M 加えたもの、NCE4N2、NCE4C 各 1  $\mu$ M 加えたものの 2 組のチューブを作製し、これらを、dNTP 存在下、95°C、5 分間熱変性を行った。その後、Taq ポリメラーゼ（リコンビナントTaq、宝酒造社製）を加え、94°C 1 分間、45°C 2 分間、72°C 3 分間の反応条件を 25 回繰り返すことにより増幅した。その結果、プライマーとしてNCE4N1、NCE4C を用いた場合のみ、約 750 bp の DNA が増幅された。これを以降のスクリーニングのプロープとして用いた。

#### 実施例 A 5：セルラーゼ成分 NCE 4 遺伝子のクローニング

##### (1) プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニング

PCR 法により増幅させた約 750 bp の DNA 断片 100 ng を、あらかじめ ECL ダイレクト DNA/RNA ラベリング検出システム（アマシャム社製）により、標識化しておいた。

実施例 2 に記載の方法に準じて作製したファージプラークは、ハイボンド N+ ナイロントランスファーメンブラン（アマシャム社製）にうつしとり、0.4 N 水酸化ナトリウムで変性した後、5 倍濃度 SSC（15 mM クエン酸三ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウム）で洗浄し、乾燥させ DNA を固定した。キットの方法に従って、1 時間のプレハイブリダイゼーション（42°C）の後、先の標識化したプロープを添加し、4 時間（42°C）ハイブリダイゼーションを行った。ラベルの洗浄は前述キットの方法に従った。まず、0.4% SDS、6 M 尿素添加 0.5 倍濃度 SSC により 42°C で 20 分間の洗浄を 2 回繰り返し、次に 2 倍濃度 SSC により室温で 5 分間の洗浄を 2 回行った。

プロープの洗浄を行ったナイロン膜は、添付されている検出溶液に 1 分間浸したあと、ハイパーフィルム-ECL（アマシャム社製）に感光させ、4 個の陽性クローンを得た。

## (2) ファージDNAの調製

E. coli LE392にファージを感染させ、8時間後ファージ粒子を集め、Grossbergerの方法 (Grossberger, D., Nucleic Acids. Res. 15 6737, 1987) により、プロテイナーゼKおよびフェノール処理後、エタノール沈殿により、ファージDNAを分離した。

## (3) 目的遺伝子のサブクローニング

4種のファージDNAをSal I で切断し、アガロース電気泳動に供した。

DNAをSouthernの方法 (Southern, E. M., J. Mol. Biol. 98:503-517, 1975) により、ナイロンメンブランにうつしとり、前記(1)のブランクハイブリダイゼーションと同一の条件で、約750bpのプロープを用いハイブリダイズさせ、5.2kbpの目的遺伝子を含むDNA断片を検出した。その結果、4種のファージDNAが同一サイズのSal I 断片を有していた。

この5.2kbpのDNA断片をセファグラスバンドプレップキット (ファルマシアバイオテック社製) を用いて分離し、E. coli JM109を用いプラスミドpUC119のSal I サイトにサブクローニングを行った。得られたプラスミドをpNCE4Salとした。

## 実施例A6：塩基配列の決定

### (1) ゲノムDNAの塩基配列解析

塩基配列決定は以下の様に実施した。

塩基配列解析装置は、A.L.F. DNAシーケンサーII (ファルマシアバイオテック社製) を用いた。シーケンシングゲルとしては、レディミックスゲル (ファルマシアバイオテック社製) または、ハイドロリンクロングレンジャー (FMC社製) とし、入手可能なアクリルアミド担体を使用した。ゲル作成用各種試薬 (N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、尿素、過硫酸アンモニウム) としては、A.L.F. グレードの試薬 (ファルマシアバイオテック社製) を用いた。塩基配列解読反

応は、オートリードシーケンシングキット（ファルマシアバイオテック社製）を用いた。ゲル作製条件、反応条件と泳動条件の各々は、各説明書の詳細を参照し、設定した。

テンプレートDNAであるpNCE4Salを、10 $\mu$ gの2M水酸化ナトリウムでアルカリ変性した後、オートリードシーケンシングキット添付のユニバーサルプライマーとアニーリングさせ、伸長反応を行った。反応産物をシーケンサーで解読したところ、546bpの塩基配列が判明した。この結果から、MNEG01なるFITC標識シーケンシングプライマーを作製し、pNCE4Salに対して反応させ、さらに解読を進めた。得られた結果から、さらに次のプライマーを作製してゆき、解読を進めた結果、NCE4の全長が解読された。作製したFITC標識シーケンシングプライマーは以下に示される通りであった。

MNEG-01: 5'-GTGATGAGGGCTGGCGACAGGCC-3' (23mer)

MNEG-02: 5'-CTGCCACCTCTATTGCCGGCAGC-3' (23mer)

MNEG-03: 5'-CCCGACGCCCTCAAGCCCGGCTG-3' (23mer)

MNEG-04: 5'-GGCTGGAGCGGCTGCACCACCTG-3' (23mer)

## (2) 塩基配列決定

上記(1)の結果をもとに、MNEG-05～MNEG-08なるFITC標識シーケンシングプライマーDNAを合成した。作製したFITC標識シーケンシングプライマーは以下に示される通りであった。

MNEG-05: 5'-GACCTGACGGAAGCTGAAGCTCG-3' (23mer)

MNEG-06: 5'-AGCAGTGCAGCCGCTGGGAGTCG-3' (23mer)

MNEG-07: 5'-TGGCAGATGAGGACGTGGTGTG-3' (23mer)

MNEG-08: 5'-CGCAGCCGGACTTGGCGTCGAAG-3' (23mer)

これらプライマーとpNCE4Salとのオートリードシーケンシングキットによる反応を行った。まず、10 $\mu$ gのプラスミドをアルカリ変性し、これを各

々のプライマーとアニーリングし、T7ポリメラーゼで反応させた。その結果、SalI断片の内、1257bpの塩基配列が決定できた。その配列は配列番号3に示される通りであった。

#### 実施例A7：イントロンの決定

イントロンの決定には、フミコーラ・インソレンスMN200-1からmRNAを調製し、逆転写酵素によりcDNAを合成し、これとゲノムの塩基配列を比較し同領域を判定した。

##### (1) 全RNAの調製

フミコーラ・インソレンスMN200-1をセルラーゼ誘導培地、好ましくは前述(N)培地において2日間培養し、菌体を遠心分離(3500rpm、10分)により回収した。そのうち2gの菌体を滅菌水で洗浄し、液体窒素で凍結したままブレンダー(日本精機社製ホモジナイザーAM-3)で粉碎した。これを4Mグアニジンチオシアン酸塩を含む変性溶液10ml(4Mグアニジンチオシアン酸塩、25mMクエン酸三ナトリウム、0.5%N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、0.1Mメルカプトエタノール)に懸濁した。室温で数分間攪拌の後、1mlの2M酢酸ナトリウム(pH4.5)で中和し、10mlのTE飽和フェノールを加えさらに攪拌した。これに2mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加え、よく攪拌した後、遠心分離(3500rpm、10分)によりフェノールで変性した菌体成分を除去した。上層(水層)を吸い取り、10mlのイソプロパノールで核酸を沈殿化した。同沈殿を遠心分離(3500rpm、10分)して核酸として回収し、70%エタノール-水で再遠心分離により沈殿を洗った。

この沈殿を3.5mlのTEに溶解の後、溶液に880 $\mu$ lの10M塩化リチウム溶液を加え、5℃で2時間冷蔵の後、遠心分離(12000rpm、10分)により沈殿を回収した。同沈殿は70%エタノールで洗い、これを全RNA画分



とした。収量は2.7 mg、収率は0.14%であった。

(2) ポリAテイル<sup>+</sup> RNA (=mRNA) の調製

mRNAの調製は、mRNAピュアリフィケーションキット (ファルマシアバイオテク社製) を用いて行った。

まず上記(1)で調製した全RNAのうち、1 mgを1 mlのエリューションバッファーに溶解し、これに65℃、10分間の熱変性処理を加えた。氷中で急冷の後、0.2 mlのサンプルバッファーを加えた。この全量のRNA溶液をオリゴ(dT)セルロースカラムにチャージし、ハイソルトバッファーで3回、ロウソルトバッファーで3回カラムを洗浄の後、65℃に加温したエリューションバッファーで溶出した。このカラム操作を2回繰り返す、mRNA画分とした。収量は19.2 µg、収率は2%であった。

(3) cDNAの合成

cDNA合成は、タイムセーバーcDNA合成キット (ファルマシアバイオテク社製) を用いて行った。

まず、5 µgのmRNAを20 µlのサンプルバッファーに溶解した。65℃、10分間の熱処理の後、ファーストストランド合成ミックスにジチオスレイトール溶液およびオリゴ(dT)プライマーと共に添加し、37℃で1時間反応させた。次に、この全量をセカンドストランドミックスに加え、12℃、30分間、次いで22℃、1時間反応させ、これをcDNAとした。

(4) セルラーゼNCE4 cDNAのPCR法による増幅

合成したcDNAのうち1 µgを鋳型とし、目的のcDNAのみをPCR法により増幅した。N末端およびC末端のプライマーとして以下の様な配列のオリゴヌクレオチドプライマーを作製した。

NCE4-CN: 5'-ATGCGTTCCTCCCTCTCCTCCGCTCCGCC-3' (30mer)

NCE4-CC: 5'-TACAGGCACTGATGGTACCACTCATTAATC-3' (30mer)

PCR反応は、以下の条件で行った。まず、フミコーラ・インソレンス cDNA 1  $\mu$ g に対し、プライマーを各 1  $\mu$ M 加え、dNTP 存在下、94℃、10 分間熱変性を行った。その後、Taq ポリメラーゼ（リコンビナント Taq、宝酒造社製）を加え、94℃ 1 分間、50℃ 2 分間、72℃ 3 分間の反応条件を 30 回繰り返すことにより増幅した。増幅された断片は、アガロースゲル電気泳動の結果、0.9 kbp の大きさであった。これをエタノール沈殿化により濃縮し、pT7 ブルー T ベクターキット（ノバジェン社製）によりクローン化した。このプラスミドを pCNCE4 とした。

#### (5) cDNA の塩基配列解析

シーケンシング反応は前述同様オートリードシーケンシングキットを用いた。

プラスミド pCNCE4 を 2 M 水酸化ナトリウムでアルカリ変性し、エタノールで沈殿化した。この一本鎖プラスミドをテンプレートとし、T7 ポリメラーゼで反応させた。前記合成プライマー MNEG01、MNEG02、MNEG03、MNEG04、MNEG05、MNEG06、MNEG07、および MNEG08 ならびにキット添付のユニバーサルプライマー、リバースプライマーを用いて反応を行い、配列を解読した。

その結果、56 bp の一つのイントロンが存在した。配列番号 3 の配列において、非翻訳開始配列およびその終了配列、イントロン内部の調整配列は下記の通りである（数字は配列番号 3 の配列位置番号である）。

Introne : 453~458、506~508、491~497

#### 実施例 A8 : NCE4 のセルロース含有繊維の毛羽除去の活性の評価

あらかじめ染色されたテンセル（コートルズ社製）生地を大型ワッシャーを用い、界面活性剤およびゴムボールを加えて毛羽出しを行った。この処理によって毛羽が生成されたテンセルを、下記条件のセルラーゼ処理により毛羽を除去し、完全に毛羽が除去されるのに必要なセルラーゼのタンパク質濃度を算出した。

試験機械：20kgワッシャー（SANYO 社製 全自動洗濯機SCW5101）

浴比：1：20

加熱：55℃

時間：60分

pH：7（10mMリン酸緩衝液）

処理液には、セルラーゼ酵素液とともにゴムボールを布重量の約2倍量加えた。

第1表

テンセルの毛羽除去に必要なタンパク量*	
NCE4	5mg/L
粗精製セルラーゼ調製液	500mg/L

\*：タンパク量はプロテインアッセイキット（バイオラッド社製）を用い、牛血清アルブミンをスタンダードとして定量した。

この結果から、NCE4は未精製セルラーゼ調製液の100分の1のタンパク質濃度で同程度のテンセルの毛羽除去が可能であることが明らかとされた。

#### 実施例A9：NCE4のデニム染めセルロース含有繊維の脱色活性の評価

糊抜きした12オンスのブルージーンズパンツを下記の条件で脱色処理をした。

試験機械：20kgワッシャー（SANYO 社製 全自動洗濯機SCW5101）

浴比：1：50

加熱：55℃

時間：60分

pH：7（10mMリン酸緩衝液）

処理液には、セルラーゼ酵素液とともにゴムボールを布重量の約2倍量加えた。

脱色度は色差系COLOR ANALYZER TOPSCAN MODELTC-1800MK2（東京電色株式会社製）を用い、Lab表示系のL値（明度）を測定した。コントロールに対

するL値の増加（白色度の増加）＝ $\Delta L$ 値により、脱色を評価した各試験区につき5点の $\Delta L$ 値を測定し（ $n=5$ ）、最大値・最小値を棄却した3点の平均値を採用した。そして $\Delta L$ 値＝7まで脱色するのに必要なセルラーゼのタンパク質濃度を算出した。

第2表

ブルージーンズの脱色に必要なタンパク量	
NCE 4	1.8 mg/L
粗精製セルラーゼ調製液	45.0 mg/L

この結果から、NCE 4は未精製セルラーゼ調製液の25分の1のタンパク質濃度で同程度のデニム染めブルージーンズの脱色が可能であることが明らかとされた。

#### 実施例A10：NCE 4のセルロース含有繊維の減量活性の評価

あらかじめ絶対乾燥重量を測定してある再生セルロース系繊維であるキュブラ（旭化成工業株式会社製：縦15cm×横10cm）を、下記の条件で酵素処理をした。

試験機械：洗濯堅牢度試験機モデルL-12（株式会社大栄科学精器製作所製）

浴比：1：50

加熱：55℃

時間：60分

pH：7（40mMリン酸緩衝液）

処理液には、セルラーゼ酵素液とともに付属のステンレスボール（株式会社大栄科学精器製作所製）を加えた。酵素処理後乾燥させ、キュブラの絶対乾燥重量を測定し、酵素処理前に対する重量減少率を測定した。そして8%の重量減少率を生じるのに必要なセルラーゼのタンパク質濃度を算出した。

第3表

8%のキュプラ重量減少に必要なタンパク量	
NCE 4	100mg/L
粗精製セルラーゼ調製液	500mg/L

この結果から、NCE 4は未精製セルラーゼ調製液の5分の1のタンパク質濃度で同程度のキュプラの減量加工が可能であることが明らかとされた。

#### 実施例B1：プラスミドpMKD01の作製

##### (1) プラスミドpUC118BNの作製

pUC118 DNA 1 $\mu$ gをBamH Iによって切断後、フェノール処理によって制限酵素を失活させた。これをエタノール沈殿し、少量のTE (10mM トリス塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA) 緩衝液に溶解した。このDNAをDNA ブランディング キット (宝酒造社製) によって末端を平滑化した。これをさらにDNA ライゲイション キット (宝酒造社製) によって連結し、自己閉環させた。得られた連結混合物をE. coli competent cells JM109 (宝酒造社製) に形質転換した。形質転換体について、100 $\mu$ g/mlのアンプシリン、1mM IPTG、0.004% X-galを含むLB寒天培地 (1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl、1.5%寒天) 上で生育可能で、かつ白色のコロニーを呈するものを選抜し、これを更に、100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むLB培地 (1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl) において一晚、37 $^{\circ}$ Cで培養した。得られた培養液から、アルカリ-SDS法を用いてプラスミドDNAを回収した。このプラスミドDNAをBamH Iによって切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、pUC118 DNAのBamH I部位を破壊したプラスミドDNAを選択した。このプラスミドDNAをpUC118BNとした。

## (2) プラスミド pUC118BSN の作製

pUC118BN DNA 1  $\mu$ g を Sph I によって切断し、前述と同様の方法により、pUC118BN の Sph I 部位を破壊したプラスミド DNA を得た。このプラスミド DNA を pUC118BSN とした。

## (3) プラスミド pM21 の作製

### (A) セルラーゼ NCE2 遺伝子の単離

フミコーラ・インソレンスから、特開平8-126492号公報に記載の方法によって得られる、セルラーゼ NCE2 遺伝子、ならびにそのプロモーターおよびターミネーター領域として上流に 1.4 Kb、下流に 0.5 Kb の DNA 配列を有する全長 3.4 Kbp の Pst I ~ Xba I 断片を、先の pUC118BSN の Pst I ~ Xba I 部位に連結した。得られたプラスミド DNA を pUC118BSN-PX とした。

### (B) プラスミド pUC118BSN-PX の部位指定変異処理

NCE2 遺伝子の N 末端の下流および終止コドンのすぐ下流に、BamH I 部位を以下のように部位指定変異により導入した。プラスミド pUC118BSN-PX により E. coli JM109 株を形質転換し、さらにヘルパーファージ M13KO7 を感染させた後、アンピシリン、カナマイシンをそれぞれ 150  $\mu$ g/ml、70  $\mu$ g/ml の濃度で含む 30 ml の、2 $\times$ YT 液体培地（1.6% バクトトリプトン、0.8% 酵母エキス、0.5% NaCl）において、37 $^{\circ}$ C で、16~20 時間培養した。培養上清より M13 の一本鎖 DNA (ssDNA) を回収した。この ssDNA と 2 種の合成オリゴヌクレオチドを用い、スカルプターインビトロミュータジェネシスシステム（アマシャム社製）を使用して、部位指定変異処理を行った。作製した合成オリゴヌクレオチドプライマーの配列は以下に示されるとおりであった。

MNC-02 5'-GAGCGCCAGAACTGTGGATCCACTTGGTGAGCAATG-3' (36mer)

MNC-03 5'-TCCGCCGTTCTGAGCGGATCCAGGCGTTTGGCGCG-3' (35mer)

部位指定変異処理したDNA混合液を、E. coli TG1に導入し、得られた形質転換体を100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1%NaCl)にて培養し、プラスミドDNAを回収した。このプラスミドDNAをBamHIによって切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、プラスミドpUC118BSN-PXに二箇所BamHI部位の導入されたプラスミドDNAを選択した。このプラスミドDNAをpM21とした。

#### (4) セルラーゼNCE3遺伝子の単離

公知のHumicola grisea 由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子(de Oliviera Alzevedo, M. et al., J. General Microbiol., 136:2569-2576, 1990)の配列をもとに、フミコーラ・インソレンス由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子(NCE3)をPCR法により単離した。

##### (A) ゲノムDNAの単離

前記実施例A3の方法によりフミコーラ・インソレンスMN200-1のゲノムDNAを得た。

##### (B) セルラーゼNCE3遺伝子のPCR法による増幅

Humicola grisea 由来のセロビオハイドロラーゼ遺伝子の配列をもとに、フミコーラ・インソレンスのNCE3遺伝子をPCR法により単離した。このNCE3を含むPCR産物が、プラスミドpM21のBamHI部位にフレームを合わせて連結できるように、各プライマーにはあらかじめBamHI部位を含む形で設計した。プライマーとして以下のような配列の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

MKA-05: 5'-GCCGCCAGCAGGCGGGATCCCTACCAACGAGAGG-3' (36mer)

MKA-06: 5'-TGATCGTCGAGTCAGGGATCCAGAATTTACAGGCAC-3' (36mer)

PCR反応はLA PCR Kit Ver.2(宝酒造社製)に従い、以下の方法で行った。まず、前述の方法によって得られるフミコーラ・インソレンスゲノムDNA1  $\mu$

gに対し、プライマーを各1  $\mu$ M、400  $\mu$ M dNTP、LA Taqポリメラーゼ2.5 Uを加え、94℃1分間、55℃2分間、72℃3分間の反応条件を30回繰り返すことにより増幅した。0.8%アガロースゲル電気泳動の結果、1.6 KbpのDNAの増幅が確認された。この1.6 KbpのDNA断片をセファグラスバンドプレップキット（ファルマシアバイオテク社製）を用いて回収し、これをpT7ブルーT-ベクターキット（ノバジェン社製）に連結した。このプラスミドDNAをpK21とした。

#### （5）プラスミドpKM04の作製

プラスミドpK21 DNAをBamH Iによって消化し、1.6 KbpのDNA断片を回収した。次に、プラスミドpM21 DNAをBamH Iによって消化し、さらに70℃で10分間処理し、制限酵素を失活させた。これを子牛由来のアルカリフォスファターゼ（宝酒造社製）によって脱リン酸化し、さらに、これを0.8%アガロースゲル電気泳動により分離し、5.2 KbpのDNA断片を回収した。pK21由来の1.6 KbpのDNA断片とpM21由来の5.2 KbpのDNA断片を連結し、プラスミドpKM04を得た。

#### （6）プラスミドpMKD01の作製

まず、公知の方法により得られる*Aspergillus nidulans*由来trp C 遺伝子のプロモーターおよびターミネーター（Mullaney, E. J. et al., Mol. Gen. Genet. 199:37-45, 1985）を用いて、特開昭59-175889号公報に記載されているデストマイシン耐性遺伝子をフミコーラ・インソレンスで発現可能にした遺伝子を作製した。これを、プラスミドpKM04のXba I 部位に導入し、プラスミドpMKD01を作製した。



### 実施例B2：プラスミドpMKD01によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

#### (1) プラスミドpMKD01の高濃度精製標品の調製

プラスミドpMKD01をフミコーラ・インソレンスに導入するために、まずpMKD01の高濃度精製標品を調製した。pMKD01をE. coli JM109に導入し、100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む100ml LB培地において一晩、37℃で培養した。得られた培養液をフレキシプレップ キット（ファルマシアバイオテック社製）を用いて精製し、1  $\mu$ g/ $\mu$ lのpMKD01プラスミドDNAを得た。

#### (2) フミコーラ・インソレンスの形質転換

フミコーラ・インソレンスMN200-1を(S)培地中37℃で培養し、24時間後、3000 rpm、10分間遠心分離により集菌した。ここで、(S)培地の組成は、前述(N)培地にグルコース(3.0%)を加え、かつアビセルを除いたものである。得られた菌体を0.5Mシュクロースで洗浄し、0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過したプロトプラスト化酵素溶液(5mg/ml Novozyme 234 (NLI社製)、5mg/ml Cellulase Onozuka R-10 (ヤクルト社製)、0.5M シュクロース)10mlに懸濁した。30℃で60～90分間振盪し、菌糸をプロトプラスト化させた。この懸濁液を濾過した後、2500 rpm、10分間遠心分離してプロトプラストを回収し、SUTC緩衝液(0.5Mシュクロース、10mM塩化カルシウム、10mMトリス塩酸(pH7.5))で洗浄した。

以上のように調製したプロトプラストを1mlのSUTC緩衝液に懸濁し、この100  $\mu$ lに対し10  $\mu$ gのDNA(TE)溶液(10  $\mu$ l)を加え、氷中に5分間静置した。つぎに、400  $\mu$ lのPEG溶液(60% PEG4000、10mM塩化カルシウム、10mMトリス塩酸(pH7.5))を加え、氷中に

20分間静置した後、10mlのSUTC緩衝液を加え、2500rpm、10分間遠心分離した。集めたプロトプラストを1mlのSUTC緩衝液に懸濁した後、4000rpmで5分間遠心分離して、最終的に100 $\mu$ lのSUTC緩衝液に懸濁した。

以上の処理を加えたプロトプラストを、200 $\mu$ g/mlのハイグロマイシンBを含むYMG培地（1%グルコース、0.4%酵母エキス、0.2%モルトエキス、1%寒天（pH6.8））上に、YMG軟寒天とともに重層し、37℃で5日間培養した後、形成したコロニーを形質転換体とした。

（3）pMKD01による形質転換株の培養およびSDS-PAGEによる評価

前記のようにプラスミドpMKD01をフミコーラ・インソレンスMN200-1に導入し、ハイグロマイシン耐性を示す株を50株選抜した。これらを（N）培地で37℃で5日間培養した。得られた培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、pMKD01による形質転換株のうち5クローンにおいて、NCE3と推定されるタンパク質バンドが、親株より3～4倍増加していた。

（4）組み換えNCE3のN末端アミノ酸残基の同定

SDS-PAGEの結果から、大量発現したタンパク質バンドがNCE3遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。まず、親株とNCE3高発現株から得られた培養上澄について、前記実施例A2の方法に従いFPLCシステムを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、主要なピークを比較した。NCE3高発現株において特に増加しているピークを分取し、凍結乾燥した。これを少量の水に溶解し、8%Gel SDS-PAGE mini（テフコ社製）を用いて電気泳動した。これを前記実施例A2の方法に従ってPVDF膜に、タンパク質を電氣的にうつしとり、コマジープリリアントブルーR-250で染色した後、脱色し、水で洗浄した。ここから、分子量66KDのタンパク質がブ

ロットされた部分を切り出し、プロットされたタンパク質を、Podell, D. N. の方法 (Podell, D. N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 81:176, 1978) に従い、修飾N末端残基を除去した。まず、目的タンパク質を切り出し、少量の0.5%ポリビニルピロリドン (分子量40,000、シグマ社製) / 100 mM酢酸溶液中で、37°Cで30分間保温した後、水でよく洗浄した。次に、Pfu ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ (宝酒造社製) により修飾N末端残基を除去し、水で洗浄、風乾した。これをプロテインシーケンサーModel 492 に供し、N末端側アミノ酸配列を15残基決定した。得られた配列は以下に示される通りであった。

N末端アミノ酸配列: Asn-Cys-Gly-Ser-Leu-Thr-Thr-Glu-Arg-His-Pro-Ser-Leu-Ser-Trp (15残基)

このN末端側アミノ酸配列は、プラスミドpMKD01の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE2、NCE3融合タンパク質のアミノ酸配列と一致した。

#### (5) pMKD01による形質転換株のFPLCによる評価

前述の様にSDS-PAGEでNCE3の大量発現が確認された5クローンの培養上澄をさらに定量するために、FPLCシステムによりカラムクロマトグラフィーを行った。その条件は前記(4)と同一とした。NCE3のピークを分取し、これを凍結乾燥し、重量を測定して高発現株と親株の生産性を比較した。その結果は、次の表に示されるとおりであった。

第4表

	NCE3生産量*
フミコーラ・インソレンスMN200-1 (親株)	0.46 g
フミコーラ・インソレンスpMKD01	1.8 g

\*: 生産量は培養液1 Lあたりの生産量である。

### 実施例B3：プラスミドpEGD01の作製

プラスミドpMKD01をBamH Iによって消化し、さらに70℃の熱処理によって制限酵素を失活させ、脱リン酸化処理し、8.2KbpのDNA断片を回収した。

次に、上記実施例A1～7で得られたフミコーラ・インソレンス由来のNCE4遺伝子の配列をもとに、PCR法によりNCE4遺伝子を増幅した。このNCE4を含むPCR産物は、前述プラスミドpMKD01の8.2KbpのBamH I断片にフレームを合わせて連結できるように、各プライマーにはあらかじめBamH I部位を含む形で設計した。プライマーとして以下の配列の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

NCE4-N: 5'-CCGGTGTGGCCGGATCCGCTGATGGCAAG-3' (30mer)

NCE4-C: 5'-TAAGGCCCTCAAGGATCCCTGCGTCTACAG-3' (30mer)

PCR反応は、以下のように行った。フミコーラ・インソレンスゲノムDNA 1μgに対し、プライマーを各1μM、400μM dNTP、Pfu DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）2.5Uを加え、94℃1分間、55℃2分間、72℃3分間の反応条件を25回繰り返すことにより0.8KbpのDNA断片を増幅した。この0.8KbpのDNA断片を回収し、これを前述pMKD01の8.2Kbp BamH I断片に連結した。このプラスミドDNAをpEGD01とした。

### 実施例B4：プラスミドpEGD01の発現

(1) プラスミドpEGD01によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

プラスミドpEGD01によるフミコーラ・インソレンスMN200-1の形質転換は、実施例B2の方法に従って行った。まず、pEGD01の高濃度精製標品を調製し、1μg/μlのpEGD01プラスミドDNAを得た。このpEGD01溶液を10μl使用して、フミコーラ・インソレンスMN200-

1を形質転換し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株を50株選抜した。これらを(N)培地で37℃で5日間培養した。得られた培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、pEGD01による形質転換株のうち10クローンにおいて、NCE4と推定されるタンパク質バンドが、親株より10~16倍増加していた。

## (2) 組み換えNCE4のN末端アミノ酸残基の同定

SDS-PAGEの結果から、大量発現したタンパク質バンドがNCE4遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決定した。まず、親株、NCE4高発現株から得られた培養上澄をFPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い、主要なピークを比較した。条件は上記実施例B2と同一とした。NCE4高発現株において特に増加しているピークを分取し、凍結乾燥した。これを少量の水に溶解した。実施例B2の方法に従って修飾N末端残基を除去した後、前述のプロテインシーケンサーによって、N末端側アミノ酸配列を決定した。その結果、2種類のN末端側アミノ酸配列がおおよそ7:3の割合で得られた。得られた配列は以下に示される通りであった。次に、修飾N末端を除去せずに前述のプロテインシーケンサーによって、N末端側アミノ酸配列を決定した。その結果、以下に示されるアミノ酸配列1のみが得られた。

N末端アミノ酸配列1 : Val-Val-Glu-Glu-Arg-Gln-Asn-Cys-Gly-Ser-Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp (20残基)

N末端アミノ酸配列2 : Asn-(Cys)-Gly-Ser-Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys)-(Cys)-Lys-Pro-Ser-(Cys) (20残基)

これらのN末端側アミノ酸配列は、プラスミドpEGD01の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE2およびNCE4融合タンパク質のアミノ酸配列と一致した。N末端側アミノ酸配列が2種類得られたことで、本融合タンパク質のシグナル配列が切断される際、複数の位置でプロセスされることが明らかとなった。

## (3) pEGD01による形質転換株のFPLCによる評価

前述の様にSDS-PAGEでNCE4の大量発現が確認された5クローンの培養上澄をさらに定量するために、FPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い、NCE4のピークを分取した。これを凍結乾燥し、重量を測定し、高発現株と親株の生産性を比較した。その結果は、次の表に示される通りであった。

第5表

	NCE4生産量*
フミコーラ・インソレンスMN200-1 (親株)	0.28 g
フミコーラ・インソレンスpMKEG1	4.5 g

\*：生産量は培養液1Lあたりの生産量である。

実施例B5：プラスミドpIED02の作製

## (1) プラスミドpID01の作製

プラスミドpEGD01をHind IIIおよびBamH Iによって消化し、7.2KbpのDNA断片を回収した。

次に、特開平8-5663号公報に記載の方法で得られるフミコーラ・インソレンス由来のNCE1遺伝子の配列をもとに、PCR法によりNCE1遺伝子のプロモーターおよびシグナル配列をコードする部分のDNAを増幅した。このNCE1プロモーターおよびシグナル配列を含むPCR産物は、前述プラスミドpEGD01の7.2KbpのHind III～BamH I断片に連結できるように、各プライマーにはあらかじめHind III、BamH I部位を含む形で設計した。プライマーとして以下の配列の合成オリゴヌクレオチドを作製した。

PNCE1-N: 5'-GTCATGAAGCTTCATTAAGGTACGTATGCAAC-3' (32mer)

PNCE1-C: 5'-GGTGATGGATCCGGCCTGCTGGGCAGCGACGC-3' (32mer)

PCR反応は、実施例3と同様に行った。フミコーラ・インソレンスゲノムDNA 1μg対し、プライマー各1μM、400μM dNTP、Pfu DNAポリメラー

ぜ2.5 Uを加え、94℃1分間、55℃2分間、72℃4分間の反応条件を23回繰り返すことにより1.5 KbpのDNA断片を増幅した。このPCR産物をHind IIIおよびBamH Iによって消化し、1.5 KbpのDNA断片を回収した。これを前述pEGD01の7.2 KbpのHind III～BamH I断片に連結した。このプラスミドDNAをpID01とした。

#### (2) プラスミドpIED02の作製

プラスミドpID01をBamH Iによって消化し、70℃の熱処理で制限酵素を失活させ、さらに脱リン酸化処理した後、8.6 KbpのDNA断片を回収した。次に、プラスミドpEGD01をBamH Iによって消化した後、NCE4遺伝子を含む0.8 KbpのDNA断片を回収した。2つの断片を連結し、プラスミドpIED02を得た。

#### 実施例B6：プラスミドpIED02の発現

##### (1) プラスミドpIED02によるフミコーラ・インソレンスの形質転換

プラスミドpIED02によるフミコーラ・インソレンスのMN200-1形質転換は、実施例B2の方法に従って行った。まず、pIED02の高濃度精製標品を調製し、1  $\mu$ g/ $\mu$ lのpIED02プラスミドDNAを得た。このpIED02溶液を10  $\mu$ l使用して、フミコーラ・インソレンスMN200-1を形質転換し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株を50株選抜した。これらを(N)培地で37℃で5日間培養した。得られた培養上澄をSDS-PAGEにより解析したところ、pIED02による形質転換株のうち5クローンにおいて、NCE4と推定されるタンパク質バンドが、親株より5～10倍増加していた。

##### (2) 組み換えNCE4のN末端アミノ酸残基の同定

SDS-PAGEの結果から、大量発現したタンパク質バンドがNCE4遺伝子由来であることを確認するために、このタンパク質のN末端アミノ酸配列を決

定した。まず、実施例B2と同様の方法によって、親株およびNCE4高発現株から得られた培養上澄についてFPLCシステムを用いたカラムクロマトグラフィーを行い、NCE4のピークを分取し、凍結乾燥した。これを少量の水に溶解した。実施例B2の方法に従って修飾N末端残基を除去した後、前述のプロテインシーケンサーによって、N末端側アミノ酸配列を15残基決定した。得られた配列は以下に示される通りであった。

N末端アミノ酸配列： Gln-Ala-Gly-Ser-Ala-Asp-Gly-Lys-Ser-Thr-Arg-Tyr-Trp-Asp-(Cys) (15残基)

このN末端側アミノ酸配列は、プラスミドpIED02の塩基配列から推定されるセルラーゼNCE1、NCE4融合タンパク質のアミノ酸配列と一致した。

### (3) pEGD02による形質転換株のFPLCによる評価

前述の様にSDS-PAGEでNCE4の大量発現が確認された5クローンの培養上澄をさらに定量するために、FPLCシステムでカラムクロマトグラフィーを行い、NCE4のピークを分取した。これを凍結乾燥し、重量を測定し、高発現株と親株の生産性を比較した。その結果は、次の表に示されるとおりであった。

第6表

	NCE4生産量*
フミコーラ・インソレンスMN200-1 (親株)	0.28 g
フミコーラ・インソレンスpIED02	2.9 g

\*：生産量は培養液1Lあたりの生産量である。



配 列 表

配列番号：1

配列の長さ：305

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro

-20

-15

-10

Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys

-5

1

5

10

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro

15

20

25

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala

30

35

40

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln

45

50

55

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr

60

65

70

75

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu

80

85

90

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln

95

100

105

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn  
110 115 120  
Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe  
125 130 135  
Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu  
140 145 150 155  
Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe  
160 165 170  
Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val  
175 180 185  
Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp  
190 195 200  
Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser  
205 210 215  
Pro Val Gly Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr  
220 225 230 235  
Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu  
240 245 250  
Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys  
255 260 265  
Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys  
270 275 280  
Leu

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 2 5 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : *Humicola insolens*

配列の特徴

特徴を表す記号 : intron

存在位置 : 4 5 3 . . 5 0 9

特徴を決定した方法 : E

配列

AATGACGGGG CAACCTCCCG CCCGGGCCCA ACTCTTGGGT TTGGTTTGAC AGGCCGTCTG	60
TCTCTTGCCT CCTCTTACTA CGCCTGCCTG GACCCTACGT CTCAACTCCG ATTCAAG	117
ATG CGT TCC TCC CCT CTC CTC CGC TCC GCC GTT GTG GCC GCC CTG CCG	165
Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro	
-20 -15 -10	
GTG TTG GCC CTT GCC GCT GAT GGC AAG TCC ACC CGC TAC TGG GAC TGC	213
Val Leu Ala Leu Ala Ala Asp Gly Lys Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys	
-5 1 5 10	
TGC AAG CCT TCG TGC GGC TGG GCC AAG AAG GCT CCC GTG AAC CAG CCT	261
Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro	
15 20 25	

GTC TTC TCC TGC AAC GCC AAC TTC CAG CGT CTC ACT GAC TTC GAC GCC 309  
 Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Leu Thr Asp Phe Asp Ala  
 30 35 40  
 AAG TCC GGC TGC GAG CCG GGC GGT GTC GCC TAC TCG TGC GCC GAC CAG 357  
 Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln  
 45 50 55  
 ACC CCA TGG GCT GTG AAC GAC GAC TTC GCG TTC GGT TTT GCT GCC ACC 405  
 Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Phe Gly Phe Ala Ala Thr  
 60 65 70 75  
 TCT ATT GCC GGC AGC AAT GAG GCG GGC TGG TGC TGC GCC TGC TAC GA 452  
 Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Gl  
 80 85 90  
 GTAAGCTTTG GTCGCGTGTG TAACACTGTG CAGGCATAGC ACTAACCACC TCCCAG G 509  
 u  
 CTC ACC TTC ACA TCC GGT CCT GTT GCT GGC AAG AAG ATG GTC GTC CAG 557  
 Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln  
 95 100 105  
 TCC ACC AGC ACT GGC GGT GAT CTT GGC AGC AAC CAC TTC GAT CTC AAC 605  
 Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn  
 110 115 120  
 ATC CCC GGC GGC GGC GTC GGC ATC TTC GAC GGA TGC ACT CCC CAG TTC 653  
 Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe  
 125 130 135

GGC GGT, CTG CCC GGC CAG CGC TAC GGC GGC ATC TCG TCC CGC AAC GAG	701
Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu	
140                      145                      150	
TGC GAT CGG TTC CCC GAC GCC CTC AAG CCC GGC TGC TAC TGG CGC TTC	749
Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe	
160                      165                      170	
GAC TGG TTC AAG AAC GCC GAC AAC CCG AGC TTC AGC TTC CGT CAG GTC	797
Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val	
175                      180                      185	
CAA TGC CCA GCC GAG CTC GTC GCT CGC ACC GGA TGC CGC CGC AAC GAC	845
Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp	
190                      195                      200	
GAC GGC AAC TTC CCT GCC GTC CAG ATC CCC TCC AGC AGC ACC AGC TCT	893
Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser	
205                      210                      215	
CCG GTC GGC CAG CCT ACC AGT ACC AGC ACC ACC TCC ACC TCC ACC ACC	941
Pro Val Gly Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr	
220                      225                      230                      235	
TCG AGC CCG CCC GTC CAG CCT ACG ACT CCC AGC GGC TGC ACT GCT GAG	989
Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu	
240                      245                      250	
AGG TGG GCT CAG TGC GGC GGC AAT GGC TGG AGC GGC TGC ACC ACC TGC	1037
Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys	
255                      260                      265	

GTC GCT GGC AGC ACC TGC ACG AAG ATT AAT GAC TGG TAC CAT CAG TGC 1085

Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys

270

275

280

CTG TAA ACGCAGGGCA GCCTGAGAAC CTTACTGGTT GCGCAACGAA ATGACACTCC 1141

Leu

CAATCACTGT ATTAGTTCTT GTACATAATT TCGTCATCCC TCCAGGGATT GTCACATATA 1201

TGCAATGATG AATACTGAAC ACAAACCTGG CCGCTTGAAC TGGCCGAAGG AATGCC 1257

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号1に記載されるアミノ酸配列の一部または1～284番の配列を有するタンパク質およびその改変タンパク質。
2. 配列番号1に記載される-21～-1番のアミノ酸配列の一部または全部をN末端側にさらに有してなる、請求項1記載のタンパク質およびその改変タンパク質。
3. エンドグルカナーゼ活性を有する、請求項1または2に記載のタンパク質およびその改変タンパク質。
4. 請求項1～3いずれか一項に記載のタンパク質またはその改変タンパク質をコードする、DNA配列。
5. DNA配列が配列番号2に記載される塩基配列の一部または全部を有する、請求項4に記載のDNA配列。
6. 配列番号2に記載される塩基配列の118～1088番の塩基配列を有する、請求項5に記載のDNA配列。
7. 請求項4～6のいずれか一項に記載のDNA配列を含んでなる、ベクター。
8. 請求項7に記載のベクターで形質転換された、宿主細胞。
9. 請求項8に記載の宿主細胞を培養し、その培養物から請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質または改変タンパク質を採取する工程を含んでなる、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質またはその改変タンパク質の製造法。
10. 請求項1～3いずれか一項に記載のタンパク質またはその改変タンパク質を含んでなる、セルラーゼ製剤。
11. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質もしくはその改変タ

ンパク質または請求項7に記載のセルラーゼ製剤と、セルロース含有繊維とを接触させる工程を含んでなる、セルロース含有繊維の毛羽除去方法。

12. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質もしくはその改変タンパク質または請求項7に記載のセルラーゼ製剤と、デニム染めセルロース含有繊維とを接触させる工程を含んでなる、デニム染めセルロース含有繊維の脱色加工方法。

13. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質もしくはその改変タンパク質または請求項7に記載のセルラーゼ製剤と、セルロース含有繊維とを接触させる工程を含んでなる、セルロース含有繊維の減量加工方法。

14. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質もしくはその改変タンパク質または請求項7に記載のセルラーゼ製剤の、セルロース含有繊維の毛羽除去のための使用。

15. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質もしくはその改変タンパク質または請求項7に記載のセルラーゼ製剤の、デニム染めセルロース含有繊維の脱色化工のための使用。

16. 請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質もしくはその改変タンパク質または請求項7に記載のセルラーゼ製剤の、セルロース含有繊維の減量化工のための使用。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02561

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl <sup>6</sup> C12N9/42, C12N15/56		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl <sup>6</sup> C12N9/42, C12N15/56		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CAS, BIOSIS PREVIEWS, WPI, GENETYX MAC/DB		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/00787, A1 (Novo Nordisk Biotech, Inc.), January 11, 1996 (11. 01. 96) & EP, 777737, A1 & FI, 9605200, A	1 - 16
X	WO, 96/17994, A1 (Novo Nordisk), June 13, 1996 (13. 06. 96) & AU, 9539791, A	1 - 16
Y	Charlotte SCHOU et al., "Stereochemistry, specificity and kinetics of the hydrolysis of reduced cellodextrins by nine cellulases" Eur. J. Biochem., 1993, Vol. 217, p. 947-953	1 - 16
Y	JP, 8-501692, A (Novo Nordisk A/S), February 27, 1996 (27. 02. 96) & WO, 94/07998, A1 & EP, 663950, A1 & FI, 9501629, A	1 - 16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
September 24, 1997 (24. 09. 97)		October 7, 1997 (07. 10. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/02561

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N 9/42, C12N 15/56

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C12N 9/42, C12N 15/56

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS, BIOSIS PREVIEWS, WPI, GENETYX MAC/DB

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 96/00787, A1 (NOVO NORDISK BIOTECH, INC) 11. 1月. 1996 (11. 01. 96) & EP, 777737, A1 & FI, 9605220, A	1-16
X	WO, 96/17994, A1 (NOVO NORDISK) 13. 6月. 1996 (13. 06. 96) & AU, 9539791, A	1-16
Y	Charlotte SCHOU et al., "Stereochemistry, specificity and kinetics of the hydrolysis of reduced cellodextrins by nine cellulases" Eur. J. Biochem., 1993, vol. 217, p. 947-953	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 09. 97

国際調査報告の発送日

07.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 B

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 8-501692, A (ノボ ノルディスクアクティーゼルスカブ) 27. 2月. 1996 (27. 02. 96) &WO, 94/07998, A1 &EP, 663950, A1 &FI, 9501629, A	1-16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**